重要檢疫病毒 ToBRFV與ToMMV 的核酸檢測技術

農試所植病組 鄭櫻慧 蔡筱婷 林玫珠 陳金枝

農試所生技組 王昭月　防檢局 黃國修 王惠雯

一、前言

菸草嵌紋病毒屬(genus Tobamovirus)是Virgaviridae病毒科最大的一屬，具有短桿狀病毒顆粒，病毒顆粒結構穩定，不需經由昆蟲媒介傳播，而是經過機械接觸傳播，如工人的手，衣服，工具等觸摸後傳播至另一植株。此病毒不侵入種子內部但以汙染種殼方式，藉由種子進行長距離傳播 (Chitra et al., 1999)，也可藉由嫁接等操作在種苗間傳播。病毒也能殘存於受污染的土壤，作為初次感染源。菸草嵌紋病毒屬病毒是危害茄科作物重要的病毒之一，自然界發現危害茄科作物的本屬病毒計有曼陀羅微斑駁病毒 (brugmansia mild mottle virus, BrMMV)、歐布達番椒病毒 (Obuda pepper virus, ObPV)、紅椒微斑駁病毒 (paprika mild mottle virus, PaMMV)、番椒微斑駁病毒 (pepper mild mottle virus, PMMoV)、長葉車前草嵌紋病毒 (ribgrass mosaic virus, RMV)、菸草潛隱病毒 (tobacco latent virus, TLV)、菸草微綠嵌紋病毒 (tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)、菸草嵌紋病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、番茄褐斑皺果病毒 (tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV)、番茄斑駁嵌紋病毒 (tomato mottle mosaic virus, ToMMV)、番茄嵌紋病毒 (tomato mosaic virus, ToMV)與黃尾花微斑駁病毒 (yellow tailflower mild mottle virus, YTMMV)等12種。ToMV是危害番茄最重要的病毒之一，有3個主要病毒株ToMV-0, 1及2，育種人員從野生種多毛番茄及秘魯番茄找到3種對抗ToMV的抗病基因：Tm-1（抗 ToMV-0, 2）、Tm-2 （抗ToMV-0, 1）及Tm-2^2（抗ToMV-0, 1, 2，與 Tm-2 基因位於相同基因座）。源自秘魯番茄的Tm-2^2 基因對於3種病毒株均有極佳抗病性與持久性，世界各國對於具有強抗病 Tm-2^2 基因之品種需求甚高。前述12種病毒中的ToBRFV與ToMMV就是因為可以擊敗抗病基因Tm-2^2，感染具有此抗病基因的番茄，使國際間聞之色變。ToBRFV是最早於2015年約旦發現的病毒 (Salem et

作　　者：鄭櫻慧副研究員
連絡電話：04-23317517

al., 2016)，除了約旦之外，加拿大、墨西哥、美國、德國、希臘、義大利、英國、以色列、中國、及北巴勒斯坦都有發現ToBRFV的報告。 ToMMV則於2013年墨西哥發現的病毒 (Li et al., 2013)，目前美國、中國、以色列和西班牙也有發生報告。台灣有紀錄感染茄科作物的菸草嵌紋病毒屬病毒計有PMMoV、TMGMV、ToMV及TMV 等4種，目前尚未發現此2種病毒。

病毒的鑑定方法有很多，早期多以病毒形態、病徵、血清學分析等方式進行，尤其是ELISA，已被廣泛作為用於植物病毒的免疫檢測方法，它的優點有可以處理大量樣本、高靈敏度、使用方便快速和定量檢測，其缺點是同屬病毒種間親緣性高，容易造成病毒鑑定的誤判。隨著分子生物學檢測技術的進步，以病毒基因體做為偵測標的變得普遍，最常用的診斷技術是PCR或RT-PCR，還可以用於區分同一病毒群中的特定和非特定成員。由於它們的靈敏度高，還可以克服植物組織中低病毒濃度的問題。本文將闡明建立ToBRFV及ToMMV這2種重要檢疫病毒的核酸檢測技術的重要性，並介紹其應用於輸入茄科種子檢測現況。

二、感染茄科菸草嵌紋病毒屬病毒基因體比對

Tobamovirus菸草嵌紋病毒屬病毒的短桿狀病毒顆粒內含一條單股RNA (+ssRNA) 基因體，約含有6,300-6,530個去氧核醣核苷酸。基因體RNA上有4個ORFs (open reading frame)，ORF1為ORF2略過終止密碼子轉譯產生，二者皆為非結構蛋白，形成複製酶複合物。ORF3、ORF4由基因體RNA對應產生2個次基因體RNA轉譯而來，ORF3轉譯出移動蛋白(movement protein, MP)；ORF4轉譯出鞘蛋白(coat protein, CP)，分子量約為17至18kDa。比較NCBI網站上登錄全長度完整基因體的11種感染茄科的該屬病毒標準株繪製親源樹(圖一)，觀察彼此之間的親源關係。ToBRFV與最相近的TMV的相同度為81.8%，ToMMV與最相近的ToMV的相同度為84.3%，台灣有紀錄的另外2病毒PMMoV與TMGMV與前述病毒在親源樹更外圍，基因體相同度更低。

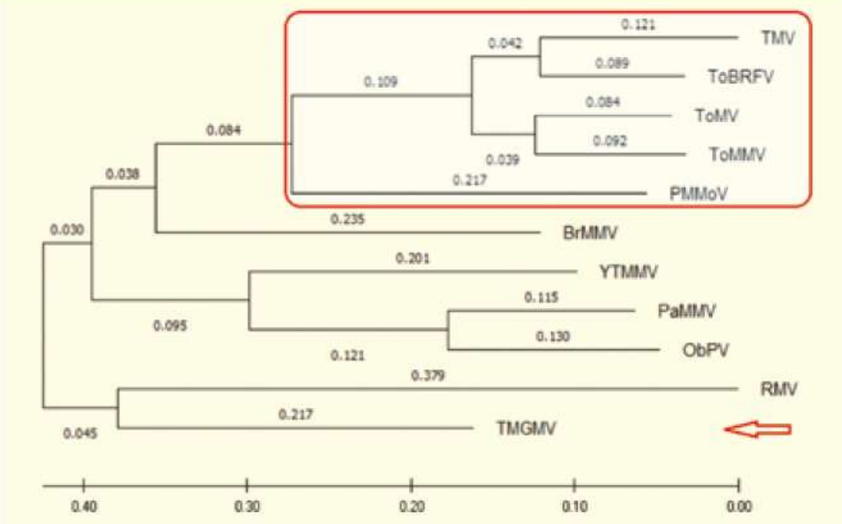
三、ELISA檢測之種間區別性探討

酵素結合免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 為實驗室中常用的一種檢測技術，其原理利用抗體與抗原專一性結合的特性，配合呈色劑反應，利用呈色深淺來定量樣品中特定目標蛋白質的含量。決定ELISA檢測效果的是抗血清或抗體，抗血清是以純化後的病原為抗原，免疫注射至動物，而其上所具有的多數抗原決定基(epitope)，在生體內針對每一抗原決定基能產生其相對應的一種抗體，如此所得之抗血清中就含有各不同抗原決定基所產生的抗體存在，即稱之為多元抗體。病毒檢測上最常用的多元抗體為純化病毒顆粒或鞘蛋白免疫動物產生之抗血清。抗原決定基最少須含

有4～6個胺基酸，圖二比對台灣有紀錄之TMV、ToMV、PMMoV、TMGMV與ToBRFV、ToMMV之鞘蛋白胺基酸序列，ToBRFV、ToMMV、TMV與ToMV的基因體核苷酸相同度約為80%左右，但其鞘蛋白胺基酸序列相同度略高於核苷酸相同度，圖二為6種病毒之胺基酸序列比對，黃色底為完全相同胺基酸，藍色底為性質相近胺基酸，6種病毒之鞘蛋白缺乏完全相異的4～6個胺基酸可以作為專一性的抗原決定基，製備單元抗體幾乎不可能，多元抗體的交叉反應不意外非常強烈 (Letschert et al., 2002)。實驗室中以ToMV製備的多元抗血清，可以測到TMV、ToMV、PMMoV、TMGMV 等4種病毒。

四、核酸檢測系統的建立與應用

專一性引子對設計：TMV、ToMV、PMMoV、TMGMV、ToBRFV與ToMMV6種病毒的基因體核苷酸相同度如圖一，雖然ToBRFV、ToMMV與PMMoV、TMGMV核苷酸相同度只有65%左右，但檢視其核甘酸比對圖相異的核苷酸幾乎均勻分布於病毒基因體，只在移動蛋白(ORF 3)的C端有較完整差異片段 (圖三)，這與前人報告Tm-2^{2}基因與移動蛋白作用，使病毒失去致病力的結論相符 (Weber et al. 1993)。根據ORF 3核苷酸相同度低的區域設計具有專一性的引子之核酸檢測法為避免病毒間相互干擾的可行方法。比對NCBI網站登錄的ToBRFV與ToMMV的核苷酸序列，依上述



(%)

	ToBRFV	ToMMV	TMV	ToMV	PMMoV	TMGMV
ToBRFV	100.0	80.9	81.8	81.1	68.8	65.2
ToMMV	80.9	100.0	78.9	84.3	69.1	65.1
TMV	81.8	78.9	100.0	79.4	69.1	64.3
ToMV	81.1	84.3	79.4	100.0	69.8	66.0
PMMoV	68.8	69.1	69.1	69.8	100.0	65.7
TMGMV	65.2	65.1	64.3	66.0	65.7	100.0

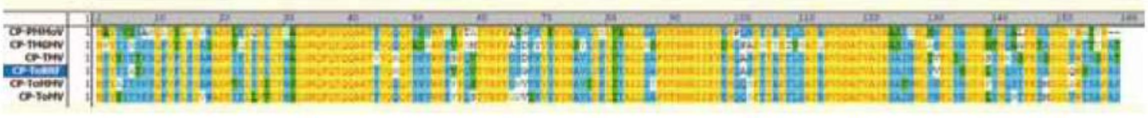
圖一、感染茄科菸草嵌紋病毒屬病毒基因體核甘酸序列以MEGA進行親緣關係分析之樹狀圖(上)以及重要檢疫病毒ToBRFV與ToMMV基因體核甘酸序列與台灣有紀錄4種病毒之相同度(下)。

區段設計上游的專一性引子(ToBRFV:5'-CAGACAAAAACCAAAGGAAGG-3'；ToMMV:5'-AAAAGGGCGGTCTAATTTCCGTAA-3')，下游引子為位於CP基因，6種病毒共用的引子(5'-TTCGATTTAAGTGRASGGRWAAVCACT-3')，預期ToBRFV產物大小約680 bp，ToMMV產物大小約693 bp。以質體進行測試時，可以專一性針對目標病毒增幅產生預期大小的DNA產物，與其他同屬病毒則無反應(圖四上)。

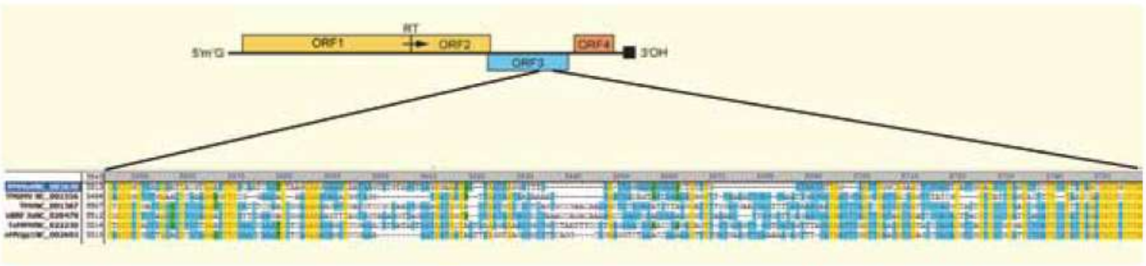
以反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 進行種子檢測：防檢局採樣之茄科種子寄至農試所，進行檢測時至多以200顆種子作為一個樣本，以醋酸鉀緩衝液浸泡，敲碎種子之萃取液，再以核酸萃取試劑套組 (TACO Plant DNA/RNA Extraction kit) (GeneReach Biotechnology Crop., Taichung, Taiwan)純化其總量核酸。RT-PCR以單一步驟RT-PCR試劑組 (DiaStarTM 2X OneStep RT-PCR Smart Mix) (SolGent Co., Korea) 進行，15 uL的反應液中加入1 uL的純化核酸為模板，各0.5 μL 之10 μM上下游引子。RT-PCR之進行於熱循環反應儀 (Biometra, Germany) 中，設定反應程序為50℃下進行反轉錄30分鐘，95℃變性15分鐘；後進行35個PCR循環反應：95℃變性20秒，52℃鍊合40秒，72℃聚合1分鐘，最後一個循環之72℃聚合反應延長為5分鐘。反應產物以1.5%電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。圖四下為檢出ToBRFV或ToMMV的結果，增幅的DNA產物經過電泳純化後，委託明欣生物科技公司進行定序分析確認。

五、結語

病毒病害沒有化學農藥可以防治，植株罹染病毒後，僅能拔除病株以及防止其傳播擴散。因此，育種導入抗病基因是防治病毒病害最重要有效的手段。

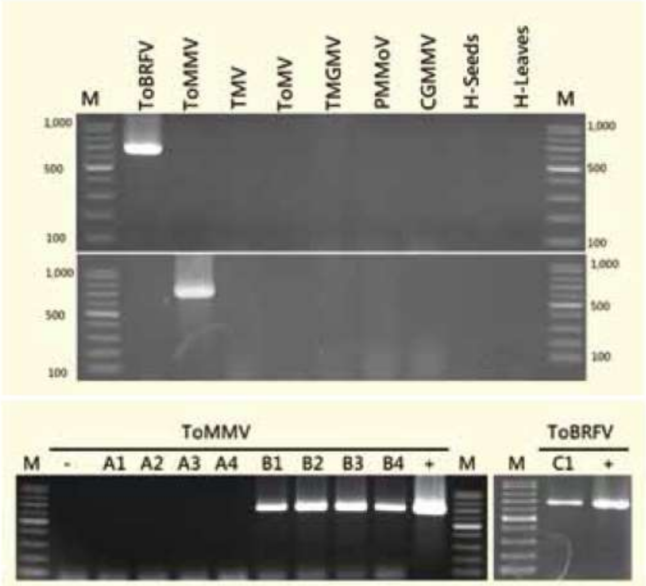


圖二、TMV、ToMV、PMMoV、TMGMV、ToBRFV與ToMMV6種病毒的鞘蛋白胺基酸序列比對。



圖三、比對TMV、ToMV、PMMoV、TMGMV、ToBRFV與ToMMV6種病毒的基因體核苷酸，在移動蛋白(ORF3)的C端有較完整差異片段。

在尚未育出抗病品種前，透過病毒檢測拒絕病毒入侵，是重要的病害管理手段。近年發現ToBRFV與ToMMV可以擊敗番茄重要的抗病基因Tm-2^2，各國紛紛對此2病毒設立檢疫關卡，希望將此2病毒阻絕於國門之外。若此2病毒傳入國內除了對番茄栽培帶來重大危害，也會妨礙茄科種子在國際間的貿易，因此動植物防疫檢疫局已於110年1月21日頒布將ToBRFV列為輸入植物檢疫規定項目，目前正進行ToMMV的風險評估等前置步驟。本試驗建立的方法可以有效地從輸入番茄種子樣本檢出ToBRFV或ToMMV，防止此2種病毒入侵，確保我國非疫區地位。



圖四、利用ToBRFV與ToMMV的專一性上游引子配合共通下游引子進行RT-PCR測試(上)，ToBRFV及ToMMV行以基因合成之質體做為模板，其他病毒以萃取自感染菸草之核酸作為模板，最右邊2行以萃取自健康種子與健康菸草之RNA作為負對照。下圖為輸入番茄種子進行檢測，樣本B檢出ToMMV，樣本C檢出ToBRFV。RT-PCR產物以1.5%膠體電泳分析。

六、參考文獻

Chitra, T. R., H. S. Prakash, S. E. Albretchsen, H. S. Shetty, and S. B. Mathur. 1999. Seed transmission of mosaic viruses in tomato and bell pepper. Trop Sci 39, 80–84.

Letschert, B., A. Günter, L. Dietrich-Eckhardt, P. Willingmann, and C. Heinze. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. J Virol Methods 106, 1–10.

Li, R., S. Gao, Z. Fei, and K.-S. Ling. 2013. Complete genome sequence of a new tobamovirus naturally infecting tomatoes in Mexico. Genome Announc. 1: e00794-13.

Salem, N., A. Mansour, M. Ciuffo, B. W. Falk, and M. A. Turina. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Arch. Virol. 161, 503–506.

Weber H, S. Schultze, and A. Pfitzner. 1993. Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-22 resistance gene in the tomato. Journal of Virology. 67, 6432-6438.